

22 **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	20 JUN 2000
WIPO	PCT

Bescheinigung

EP00/03949

ESY *[Signature]*

Die Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG in Frankfurt am
Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Spleißosomprotein und seine Verwendung"

09/980372

am 4. Juni 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Februar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

[Signature]

Aktenzeichen: 199 25 668.3

Waasmaier



Spleißosomprotein und seine Verwendung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spleißosomprotein, das mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziiert ist und für dieses Spleißosom spezifisch ist. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung dieses Proteins und der hierfür codierende DNA-Sequenzen bei der Diagnostik von Autoimmunkrankheiten und von Krankheiten, die auf Defekten des Spleißapparats beruhen.

10

Zahlreiche eukaryontische Protein- oder auch RNA-codierende Gene sind mosaikartig zusammengesetzt, wobei sich einzelne, für Teilbereiche des Genprodukts codierende Sequenzen (Exons) und intervenierende, nicht für das Genprodukt codierende Sequenzen (Introns) abwechseln. Die Primärtranskripte solcher Mosaikgene enthalten daher in ihrer RNA-Kette sowohl die von den Exons als auch die von den Introns codierten Sequenzen und müssen für eine korrekte Genexpression erst noch prozessiert werden.

20

Einer der wesentlichen Prozessierungsschritt ist das Spleißen, das im Zellkern erfolgt. Im Falle der Expression von Protein-codierenden Genen werden hierbei aus längerkeittigen Primärtranskripten, der sog. prä-mRNA, unter Bildung von reifer mRNA Introns entfernt. Der Spleißvorgang wird durch Exon-RNA-Sequenzen miteinander verknüpft. Der Spleißvorgang wird durch ein sogenanntes Spleißosom, einen großen Ribonucleoprotein-Komplex, katalysiert, der sich stufenweise aus mehreren kleinen nucleären Ribonucleinprotein-Partikeln (small nuclear RNPs, snRNPs), die ihrerseits aus Uridin-reichen RNAs (small nuclear RNAs, snRNAs) und spezifisch an diese bindenden Proteinen bestehen, und aus nicht fest an diese snRNPs gebundenen Proteinen, den sog. nicht-snRNP-Spleißfaktoren, zusammenlagert. Das Spleißen erfolgt im allgemeinen nach einem zweistufigen Mechanismus, wobei in jeder Stufe ein Transensifizierungsschritt beteiligt ist. Im ersten Schritt wird nach Bindung des Spleißosoms an die 5'-Spleißstelle und die sog. Verzweigungsstelle im Intron ein freies 5'-Exon und eine sog. Lariat-Struktur des Introns generiert, wobei das Intron noch mit dem 3'-Exon

35



verbunden ist. Im zweiten Schritt werden dann die beiden Exons ligiert und das Intron freigesetzt.

5

Die Mehrzahl der Introns von prä-mRNA in Metazoen besitzt an den Enden invariable GU- und AG-Dinucleotide. Diese Introns werden durch das sog. GT-AG-Spleißosom (oder major Spleißosom), das diese Dinucleotide erkennt, ausgeschnitten. Das Spleißosom enthält die U1, U2, U5 und U4/U6 snRNPs, die sich aus einer (U1, U2, U5) oder zwei (U4/U6) RNAs und zahlreichen Proteinen, beispielsweise Proteinen der Sm-Klasse zusammensetzen. Die Erkennung von Spleiß- und Verzweigungsstelle der sog. U2-abhängigen Introns durch das Spleißosom erfolgt mittels Wechselwirkungen, bei denen sowohl RNA als auch Proteine beteiligt sind. So wird die Duplexbildung zwischen U1 snRNA und 5'-Spleißstelle durch verschiedene Polypeptide, wie das 70K- und das C-Protein des U1 snRNPs sowie Proteine der Familie der Ser- und Arg-reichen SR-Proteine, erleichtert. Die Basenpaarung zwischen U2-snRNA und der Verzweigungsstelle erfordert in ähnlicher Weise zahlreiche U2-snRNP-Proteine, insbesondere die Untereinheiten der heteromeren Spleißfaktoren SF3a und SF3b [R. Reed, Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 215 (1996); C.L. Will und R. Lührmann, Curr. Opin. Cell Biol. 9, 320 (1997); A. Krämer, Annu. Rev. Biochem. 65:367 (1996)]

20

In jüngerer Zeit konnte ein alternatives Spleißosom, das sog. AT-AC-Spleißosom, identifiziert werden, das sich aus den U11, U12, U5 und U4atac/U6atac snRNPs zusammensetzt und eine seltene Klasse von mRNA-Introns spleißt, die an ihren Termini AU- und AC-Dinucleotide aufweisen [C.B. Burge et al. In: The RNA World II, R.F. Gesteland und J.F. Atkins, Hrsg., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N.Y., 1999, p. 525]. Diese sog. U12-abhängigen Introns werden im Vergleich mit den U2-abhängigen Introns nur mit geringer Häufigkeit angetroffen und enthalten hochkonservierte Sequenzelemente an der 5'-Spleißstelle und der Verzweigungsstelle, die sich von den schwach konservierten Sequenzen der U2-abhängigen prä-mRNA-Introns unterscheiden [C.B. Burge et al. In: The RNA World II, R.F. Gesteland und J.F. Atkins, Hrsg., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N.Y., 1999, p. 525; S.L. Hall und R.A. Padgett, J. Mol. Biol. 239:357 (1994); P.A. Sharp und C.B. Burge, Cell 91:875 (1997)]. Während der Zusammenlagerung des AT-AC-Spleißosoms bindet das U11-snRNP durch Basenpaarung mit der 5'-Spleißstelle und das U12-snRNP mit der Verzweigungsstelle [S.L. Hall und

35



R.A. Padgett, Science 271:1716 (1996); W.-Y. Tarn und J.A. Steitz, Cell 84:801 (1996); W.-Y. Tarn und J.A. Steitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6030 (1997); I. Kolosova und R.A. Padgett, RNA 3:227 (1997)]. Anschließend erfolgt die Bildung des reifen Spleißosoms durch Assoziation der U5- und U4atac/U6atac-snRNPs [W.-Y. Tarn und J.A. Steitz, Science 273:1824 (1996)]. Die U11- und U12-snRNPs liegen in Kernextrakten als hochstabile 18S-U11/U12-Komplexe vor [K.M. Wassarman und J.A. Steitz, Mol. Cell Biol. 8, 1276 (1992)], und jüngere in-vitro-Bindungsstudien lassen vermuten, daß U11 und U12 mit der prä-mRNA als vorgebildeter Komplex in Wechselwirkung treten [M. Frländer und J.A. Steitz, Genes & Dev. 13:851 (1999)]. Diese Beobachtungen lassen zusammen mit der Tatsache, daß Introns vom U12-Typ nicht den wesentlichen Pyrimidintrakt der 3'-Spleißstelle der Hauptklasse-Introns aufweisen, vermuten, daß zwischen den Mechanismen der Spleißstellenerkennung bei den verschiedenen Spleißosomen Unterschiede bestehen.

Die Identifizierung und Charakterisierung der für das AT-AC-Spleißosom charakteristischen Proteine könnte daher nicht nur Aufschluß über den genauen Mechanismus der in diesem Spleißosom ablaufenden Spleißvorgänge liefern, sondern gleichzeitig eine Diagnose und Therapie von Krankheiten ermöglichen, die auf Störungen im Spleißmechanismus dieses Spleißosoms zurückzuführen sind. Die Bereitstellung spezifischer Proteine ermöglicht ferner das Auffinden und die Entwicklung potentieller Spleißmodulatoren, die ebenfalls vorteilhaft bei der Behandlung von durch Störungen des Spleißvorgangs bedingten Erkrankungen eingesetzt werden können

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein für das AT-AC-Spleißosom charakteristisches Protein bereitzustellen.

Diese Aufgabe konnte durch ein Spleißosomprotein gelöst werden, das mit dem 18S U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziiert ist und spezifisch für dieses Spleißosom ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins, welches durch eine DNA-Sequenz codiert wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus



a) DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der Aminosäuresequenz nach Fig. 3 codieren;

b) DNA-Sequenzen, die mit den zu den Sequenzen unter a) komplementären Sequenzen hybridisieren und befähigt sind, ein Protein mit der Funktion des 35kD-Proteins des U11/U12 snRNP-Komplexes zu codieren; und

c) DNA-Sequenzen, die in ihrem genetischen Code bezüglich der unter a) oder b) genannten Sequenzen degeneriert sind;

Unter „Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins“ ist hierbei jedes Protein zu verstehen, das im wesentlichen die Eigenschaften des natürlich vorkommenden, insbesondere des humanen, 35kD-Proteins des U11/U12 snRNP-Komplexes besitzt, also im Spleißosomkomplex die korrekte Funktion des genannten Spleißosoms gewährleistet.

Der Begriff Hybridisierung bedeutet hier eine Hybridisierung unter üblichen Hybridisierungsbedingungen, insbesondere unter stringen Hybridisierungsbedingungen, wie sie dem Fachmann bekannt sind [vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

Bevorzugt besitzt das Spleißosomprotein die Aminosäuresequenz nach Fig. 3. Das Protein kann jedoch auch ein oder mehrere Aminosäuredeletionen, Aminosäureaustausche oder Aminosäureadditionen oder -insertionen aufweisen, solange die Funktion des Proteins dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Beispielsweise kann das Spleißosomprotein auch mit fremden Proteinsequenzen fusioniert sein.

Das bevorzugte erfindungsgemäße Spleißosomprotein mit einer Länge von 246 Aminosäuren besitzt ein apparentes Molekulargewicht, bestimmt durch SDS-Page, von ungefähr 35kD und ein berechnetes Molekulargewicht von 29kD und einen isoelektrischen Punkt von 9,88.



Ein weiterer Gegenstand sind die für dieses Protein codierenden DNA-Sequenzen nach Anspruch 1, zu diesen Sequenzen komplementäre Sequenzen, sowie Fragmente davon.

5 Diese DNA-Sequenzen mit können mit anderen DNA-Sequenzen, insbesondere Sequenzen, die die Expression des Proteins in einem gewünschten Wirtssystem ermöglichen, verknüpft werden. Solche Sequenzen sind im Stand der Technik bekannt. Es handelt sich hierbei beispielsweise um regulatorische Sequenzen wie Promotorsequenzen, Shine-Dalgarno-Sequenzen, Transkriptionsterminationssignale, Polyadenylierungssignale oder Enhancer-Elemente. Auf diese Weise läßt sich das gewünschte Protein kostengünstig in großen Mengen gewinnen.

15 Gegenstand der Erfindung sind daher auch rekombinante DNA-Moleküle, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthalten.

Die rekombinanten DNA-Moleküle können entweder direkt in den gewünschten Wirtssystemus eingeschleust werden oder zuerst in Vektoren eingebaut werden, mit denen die Wirtssystemen anschließend in an sich bekannter Weise transformiert werden. Solche Vektoren sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Als Vektoren können die im Stand der Technik üblichen Vektoren, beispielsweise Plasmide, Bakteriophagen oder Viren, verwendet werden. Bevorzugte Vektoren sind Expressionsvektoren.

25 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Wirtssystemen, die die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle oder Vektoren enthalten.

Geeignete Wirtssystemen sind beispielsweise prokaryontische oder eukaryontische Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien wie *Escherichia Coli*, Hefen oder Gewebezellen.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Fragmente davon können dazu verwendet werden, homologe DNA-Sequenzen in verschiedenen Organismen oder Gewebetypen aufzufinden, die eine ähnliche oder gleiche Funktion wie das erfindungsgemäße Spleißosomprotein besitzen.



Das erfindungsgemäße Protein und die für dieses Protein codierenden DNA-Sequenzen lassen sich ferner vorteilhaft als Diagnostika, beispielsweise für Autoimmunkrankheiten und von Erkrankungen, die auf Störungen im Spleißmechanismus zurückzuführen sind.

5 So ist es bekannt, daß Spleißosomkomponenten als Autoantigene wirken können. Patienten, die von der Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus erythematoses betroffen sind, produzieren beispielsweise häufig Antikörper, mit denen die meisten snRNPs präzipitierbar sind. Das erfindungsgemäße Protein eröffnet nunmehr auf dem Wege eines einfachen Immunassays eine Möglichkeit zur raschen Diagnose von Autoimmunerkrankungen, die auf einer Bildung von Antikörpern gegen Proteine beruhen, die für das AT-AC-Spleißosom spezifisch sind.

15 Krankheiten, die auf Störungen im Spleißmechanismus des AT-AC-Spleißosoms zurückzuführen sind, die auf einem Defekt im 35kD-Proteins beruhen, lassen sich beispielsweise mit Hilfe von Komplementationstests in im Stand der Technik bekannten in-vitro-Spleißsystemen diagnostizieren. Hierbei wird beispielsweise durch in-vitro-Transkription zunächst eine prä-mRNA mit einem U12-abhängigen Intron hergestellt, das sämtliche Strukturelemente enthält, die für die Erkennung der prä-mRNA durch das Spleißosom und für den Spleißvorgang notwendig sind. Die RNA wird beispielsweise radioaktiv markiert, damit später nach Auftrennung auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgrund der charakteristischen Bandenmuster bei 25 werden kann, ob eine Spleißreaktion stattgefunden hat. Anschließend werden Proben aus Patientengewebe mit und ohne Zusatz des erfindungsgemäßen 35kD-Proteins getestet. Eine Komplementation weist dann den Defekt in besagtem Protein nach.

30 Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können im Wege üblicher Hybridisierungstests zur Diagnose von Defekten im Gen für das beschriebene 35kD-Protein eingesetzt werden, insbesondere bei der pränatalen Diagnostik.

Das erfindungsgemäße Protein kann ferner als Therapeutikum bei auf 35 Spleißdefekten beruhenden Erkrankungen verwendet werden.

Ferner läßt sich das erfindungsgemäße Spleißosomprotein vorteilhaft zum Auffinden oder Entwickeln von Spleißomodulatoren, z.B. Spleißinhibitoren, verwenden, die dann zur Behandlung weiterer Krankheiten geeignet sind. So wurden jüngst U12-abhängige Introns in den mutanten Genen identifiziert, die für das autosomal rezessive Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) verantwortlich sind. Es ist zu erwarten, daß solche Introns in Zukunft auch noch in weiteren Genen gefunden werden, denen ein Rolle bei genetisch bedingten Erkrankungen zugeschrieben werden kann. Eine gezielte Inhibierung des Spleißens der in solchen Genen vorhandenen Introns und damit der Expression der schädlichen mutierten Gene stellt daher einen möglichen Weg zur Therapie der genannten Krankheiten dar. Wegen des seltenen Vorkommens der U12-abhängigen Introns können solche Spleißinhibitoren bei AT-AC-Spleißosomen auch therapeutisch wirksamer eingesetzt werden als bei GT-AG-Spleißosomen.

Zur Auffindung der gesuchten Spleißomodulatoren können die bereits oben erwähnten, bekannten in-vitro-Testsysteme zur Untersuchung von Spleißmechanismen verwendet werden. Spleißomodulatoren oder -inhibitoren, die sich auf diese Weise analysieren lassen, sind beispielsweise monoclonale Antikörper. So wurde die Beeinflussung von Spleißvorgängen in der Zelle mit Hilfe von Antisera oder monoclonalen Antikörpern, beispielsweise der Generierung reifer mRNA, bereits beschrieben [R.A. Padgett et al, Cell 35:10 (1983); R. Gattoni et al, Nucleic Acid Res. 24:2535 (1996)].

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt die snRNA-Zusammensetzung gereinigter snRNPs.

Fig. 2 zeigt die Proteinzusammensetzung von mit Oligonucleotiden selektierten U11/U12 snRNPs.

Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des U11/U12-assoziierten 35kD-Proteins zusammen mit der codierenden DNA-Sequenz

Fig. 4 zeigt die gesamte cDNA-Sequenz für das U11/U12-assoziierte 35kD-Protein einschließlich nicht-codierender Sequenzen. Die codierende Sequenz mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist unterstrichen.

Die Isolierung des erfindungsgemäßen U11/U12-assoziierten 35kD-Proteins wird im folgenden beispielhaft erläutert.

Beispiele

Präparation von HeLa-Kernextrakten

Zur Herstellung von Kernextrakten aus HeLa-Zellen wurden Zellkulturen mit HeLa-Zellen kultiviert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (1000 x g, 10 Min.) aus dem Kulturmedium sedimentiert und mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in fünf-fachem Volumen Puffer A (10mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5 mM DTT, pH 7,9, 4 °C) aufgenommen und 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und in zweifachem Volumen Puffer A aufgenommen. Diese Suspension wurde mit einem Dounce Homogenisator (Pistill B) aufgeschlossen (10-faches Auf- und Abbewegen des Pistills). Die Kerne wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurden die Kerne erneut in Puffer A aufgenommen und für 20 Minuten bei 25.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml Puffer B (20 mM HEPES, 25 % (v/v) Glycerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,5 mM DTT, pH 7,9) aufgenommen und erneut mit dem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Die entstehende Suspension wurde 30 Minuten auf einem Magnetritzer inkubiert und anschließend bei 25.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Erneut schloß sich eine Zentrifugation bei 25.000 x g (30 Min.) an. Der klare Überstand wurde gegen das 50-fache Volumen Puffer C (20 mM HEPES, 20 % (v/v) Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, pH 7,9) dialysiert. Das Dialysat wurde zentrifugiert (25.000 x g, 20 Min.). Der resultierende Überstand kann als Kernextrakt in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Dignam, J. D. et al. (1983) Nucleic Acid Res., 11, 1475).



Isolierung und Analyse von snRNPs

5 Spleißosomale snRNPs, die zuvor mit einem Trimethylguanin (m3G)-Cap versehen worden waren, wurden aus Kernextrakten von HeLa-Zellen durch Immunaffinitäts-Chromatographie mit anti-m3G-Antikörpern gereinigt und durch Sedimentation durch einen 10-30%igen Glyceringradienten fraktioniert [B. Lagerbauer, J. Lauber und R. Lührmann, Nucleic Acids Res. 24:868 (1996)]. Fraktionen, die die 18 S U11/U12 snRNP-Komplexe enthielten, wurden gepoolt und die KCl-Konzentration auf 250 mM eingestellt. Die snRNPs von 2,4 ml der gepoolten 18S-Gradientenfraktionen wurden 16h bei 4°C mit 12 µg Oligonukleotid, das entweder zu den Nukleotiden 2'-18 von humaner U11 snRNA, 5'-ACGACAGAGAGCCUUUUdT⁺dt⁺gt⁺gt⁺-3' (U11-Oligo), oder zu den Nukleotiden 11-28 von humaner U12 snRNA, 5'-AUUUUUUUUACUCUAAGdt⁺dt⁺gt⁺gt⁺-3' (U12-Oligo), komplementär ist, inkubiert, wobei * ein biotinyliertes 2'-Deoxythymidin und A, U, G und C 2'-O-methylribonucleotide bedeuten. Die Oligonukleotid-gebundenen snRNPs wurden mit Streptavidin-Agarose in an sich bekannter Weise präzipitiert [A.I. Lamond und B.S. Sproat, in RNA Processing: A Practical Approach, D. Rickwood und B.D. Hames, Hrsg. (Oxford University Press, Oxford, 1996) p. 103]. Die RNA aus 1/5 der Agarose-präzipitierten snRNPs wurde durch 30-minütige Inkubation bei 95°C in 100 µl DH-Puffer (15 mM NaCl, 1,5 mM NaCitrat, 0,1 % SDS) eluiert, auf 10%igen Polyacrylamid-7M-Harnstoff-Gelen fraktioniert und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Identität der selektierten RNAs als U11 und U12 wurde durch Northern-Blotting bestätigt. Von den restlichen Kugelnchen wurde das Protein durch 5-minütige Inkubation bei 95°C in 200 µl S-Puffer (60 mM Tris, pH 6,8, 1 mM EDTA, 17,5% Glycerin, 2% SDS, 0,2 M DTE) eluiert und mit 5 Volumeneinheiten Aceton präzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE auf Gelen mit 10% (obere Hälfte) und 13% (untere Hälfte) Polyacrylamid fraktioniert und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurden auch RNA und Protein aus 50 µl des Ausgangsmaterials (gepoolte 18S-Gradientenfraktionen) analysiert.

Die Ergebnisse für das U11-Oligo sind in Fig. 1, Spur 2, diejenigen für das U12-Oligo in Fig. 1, Spur 3, dargestellt. Spur 1 zeigt die snRNAs des Ausgangsmaterials (Input); Spur 4 zeigt die Kontrolle der Präzipitation in Abwesenheit von Oligonukleotiden (Mock). Die Koselektion von U12 mit einem



gegen U11 gerichteten Oligonukleotid und umgekehrt zeigte, daß hauptsächlich U11/U12 snRNP-Komplexe und nicht U11- oder U12-Monopartikel selektiert worden waren. Dementsprechend zeigt Fig. 2, Spuren 2 und 3, identische Proteinmuster der U11/U12 snRNPs, unabhängig davon, mit welchem Oligonukleotid diese selektiert worden waren. Das Molekulargewicht der Proteine (in kD) ist rechts angegeben. Spur 1 zeigt wiederum die Proteine des Ausgangsmaterials (Input) und deren Identität (linke Seite). Spur 4: Kontrolle.

10 Identifizierung von mit dem U11/U12 snRNP-Komplex assoziierten Proteinen

Von den 20 unterschiedlichen im U11/U12-Komplex gefundenen proteinen migrierten 8 mit den Sm snRNP-Kernproteinen B', B, D3, D2, D1, E, F, und G, die in den snRNPs des major Spleißosoms anwesend sind (Fig. 2, Spuren 1-3). Antikörper, die spezifisch mit B'/B, D3, D2, F oder G reagierten, erkannten auch die Proteine identischen Molekulargewichts auf Immunoblots des U11/U12-Komplexes. U11/U12 enthält daher dieselben 8 Sm-Proteine, die auch im major Spleißosom gefunden werden.

Von den 12 restlichen U11/U12 Proteinen migrierten die 160kD-, 150kD-, 130kD- und 49kD-Proteine des U11/U12-Komplexes mit vier der für den 17S U2-Komplex spezifischen Proteine, die den essentiellen Spleißfaktor SF3b ausmachen, nämlich U2-160, U2-150, U2-120 und U2-53. Antikörper gegen U2-160, U2-150 und U2-120 gerichtet waren, reagierten außerdem stark mit den 160kD-, 150kD und 130kD-Proteinen des U11/U12-Komplexes. Peptidsequenzen, die durch Mikrosequenzierung der 160kD-, 150kD-, 130kD- und 49kD-Proteine des U11/U12-Komplexes erhalten worden waren (Tabelle I), erwiesen sich als im wesentlichen identisch mit den bekannten Sequenzen von SF3b. Die genannten vier Proteine sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit mit den aus SF3b bekannten Proteinen identisch, wobei Abweichungen in den apparenten Molekulargewichten einiger der comigrierenden Proteine auf Unterschiede in den Elektrophoresebedingungen zurückzuführen sind, die bei der ursprünglichen Identifizierung der U2 snRNP-Proteine angewandt wurden.



Tabelle I

U11/U12 Protein	Peptide
160kD	KMNARTYMDVMREQHLTK KLTATPTPLGGMTGF KAIVNVIGMH
150kD	KRIFEAFK KLRRMNRFTVAE KRTGIQEMREALQEK KLTIHGDLYYEG
130kD	KLGAFFNQVAFPLQYT KLLRVYDLGK KNVSEELDRTPPEVSK KLENIAGRYAF
49kD	KVSEPLLXELFLQ KDRVGTGHHQGYGFVEFLSEE

X bedeutet hierbei eine beliebige Aminosäure

Charakterisierung des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex assoziierten 35kD-Proteins

Von den restlichen Proteinen wurde das mit dem U11/U12 snRNP-Komplex assoziierte 35kD-Protein charakterisiert. Hierzu wurden durch Mikrosequenzierung von dem gefraktionierten, Trypsin-verdauten 35kD-Protein die Peptide KEYDPLK und KRWQEREPTRVWPDND erhalten. Mit diesen Peptiden wurde mittels des TBLASTN-Programms in der EST-Datenbank des National Center for Biotechnology Information eine Suche nach cDNAs durchgeführt. Beide Peptide wurden in einem ORF einer cDNA aus humanen Makrophagenzellen (Genbank-Accession-No. U44798), die für ein unbekanntes Protein codierte, gefunden. Eine zweite cDNA aus humanen

Muskelzellen mit einem identischen ORF (Genbank-Accession No. AA211268) in pBluescript SK wurde nach Transformation in E.coli HB101 mit einem ABI PRISM-Sequenzanalyser vollständig sequenziert. Die für das 35kD-Protein codierende DNA-Sequenz ist in Fig. 3 zusammen mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz wiedergegeben. Fig. 4 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz einschließlich nicht-codierender 5'- und 3'-Sequenzen.

Von der cDNA wurde durch in-vitro-Translation Protein hergestellt (TNT (Coupled Transcription/Translation)-Kit der Fa. Promega). Das Protein migrierte auf einem SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit dem gereinigten 35kD-Protein, was zeigte, daß die DNA vollständiges Protein codierte.

Das U11/U12-35kD-Protein besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM; Aminosäuren 51-129). Diese Region und die benachbarte Glycin-reiche Region sind sehr ähnlich zu einer Region des U1-70K-Proteins. Antisera gegen das 35kD-Protein präzipitierten darüber hinaus effizient U11 aus einer Mischung von durch einen Gradienten fraktionierten snRNPs, die U11-Monopartikel enthielten. Analog zu U1-70K dürfte das U11-35kD-Protein daher die Erkennung der 5'-Splice-Stelle erleichtern. Ferner dürfte das Protein in Wechselwirkung mit Komponenten des major Spleißosoms an der Exonverknüpfung beteiligt sein.



Patentansprüche

1. DNA-Sequenz codierend für ein Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der Aminosäuresequenz nach Fig. 3 codieren;
 - b) DNA-Sequenzen, die mit den zu den Sequenzen unter a) komplementären Sequenzen hybridisieren und befähigt sind, ein Protein mit den funktionellen Eigenschaften des 35kD-Proteins des U11/U12 snRNP-Komplexes zu codieren; und
 - c) DNA-Sequenzen, die in ihrem genetischen Code bezüglich der unter a) oder b) genannten Sequenzen degeneriert sind;
 sowie Fragmente dieser Sequenzen und die zu den unter a), b) und c) genannten Sequenzen oder den Fragmenten davon komplementären Sequenzen.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, umfassend die Nukleotidsequenz nach Fig. 3 oder Fig. 4, hierzu komplementäre Sequenzen sowie Fragmente dieser Sequenzen.
3. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2.
4. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 3, worin die für das Spleißosomprotein codierende DNA mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression des Proteins in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen ermöglichen.
5. Vektor, enthaltend eine Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 oder ein rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 3 oder 4.



6. Wirtsorganismus, enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül nach irgendeinem der Ansprüche 3 oder 4 oder einen Vektor nach Anspruch 5.
7. Wirtsorganismus nach Anspruch 6, welcher ein prokaryontischer Mikroorganismus ist.
8. Wirtsorganismus nach Anspruch 6, welcher ein eukaryontischer Mikroorganismus ist.
9. Spleißosomprotein mit der Funktion des mit dem U11/U12 snRNP-Komplexes des AT-AC-Spleißosoms assoziierten 35kD-Proteins, welches durch eine der Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 codiert wird.
10. Spleißosomprotein nach Anspruch 9, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) einem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz nach Fig. 3;
 - b) einem Polypeptid, das im Vergleich mit der Sequenz nach a) eine oder mehrere Aminosäuredeletionen, Aminosäureaustausche, Aminosäureadditionen und/oder Aminosäureinsertionen aufweist.
11. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Fragments davon zur Isolierung homologer DNA- oder RNA-Sequenz
12. Verwendung eines Spleißosomproteins nach Anspruch 9 zum Auffinden von Spleißomodulatoren.
13. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 und/oder eines Spleißosomproteins nach Anspruch 9 zur Herstellung von Diagnostika.
14. Spleißosomprotein nach Anspruch 9 als Therapeutikum und/oder Diagnostikum.



Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Spleißosomprotein, das mit dem U11/U12 snRNP-Komplex des AT-AC-Spleißosoms assoziiert ist und für dieses Spleißosom spezifisch ist. Dieses Protein und die hierfür codierende DNA-Sequenz können bei der Diagnostik bestimmter Autoimmunkrankheiten und von Krankheiten verwendet werden, die auf Defekten im Spleißapparat beruhen.

10

Fig. 3

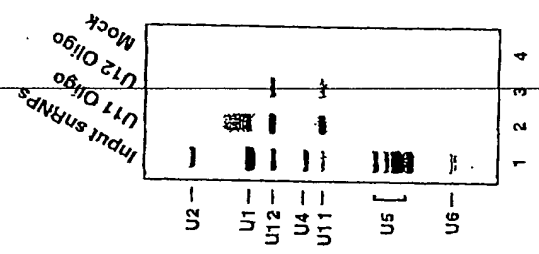


Fig. 1



3/4

Fig. 3

[illegible]

